

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-154567

(43) 公開日 平成9年(1997)6月17日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M	3/00		C 1 2 M 3/00	Z
C 1 2 N	5/06		C 1 2 N 5/00	E

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平7-337699

(22) 出願日 平成7年(1995)12月4日

(71) 出願人 000004226

日本電信電話株式会社  
東京都新宿区西新宿三丁目19番2号

(72) 発明者 前田 英作

東京都新宿区西新宿三丁目19番2号 日本  
電信電話株式会社内

(72) 発明者 川名 明夫

東京都新宿区西新宿三丁目19番2号 日本  
電信電話株式会社内

(74) 代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

(54) 【発明の名称】 複数の細胞群及び組織を培養する方法及び装置

(57) 【要約】

【課題】 複数の細胞群及び組織が混ざり合うことなく、同一環境下で培養でき、細胞群及び組織間のシナプス結合が容易に且つ安定に形成される方法及び装置を提供する。

【解決手段】 培養用底板上に設けたコラーゲンゲルの薄膜を隔壁とした培養用セル中に、複数の細胞群又は組織をそれぞれ各壁間に挿入し、培養用溶液を添加後、各々の細胞群又は組織を同一環境下で培養し、各々の細胞群又は組織で、コラーゲンゲル薄膜を介して機能的なシナプスを形成させる培養方法。当該方法に使用する装置で、隔壁としてコラーゲンゲルの薄膜を用いた装置。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 培養用底板上に設けたコラーゲンゲルの薄膜を隔壁とした培養用セル中に、複数の細胞群若しくは組織をそれぞれ各壁間に挿入し、培養用溶液を添加後、各々の細胞群又は組織を同一環境下で培養し、各々の細胞群又は組織で、上記コラーゲンゲル薄膜を介して機能的なシナプスを形成させることを特徴とする細胞群又は組織を培養する方法。

【請求項2】 培養用底板上に、複数の細胞群若しくは組織をそれぞれ挿入できるように隔壁を設けた培養用セルを設置した培養装置において、隔壁としてコラーゲンゲルの薄膜を用いたことを特徴とする細胞群又は組織の培養装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、複数の細胞群及び組織を培養するための方法及び装置についての改良に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、複数の細胞群及び組織を培養する方法及び装置として、(1) 複数の組織や細胞群を別々に培養皿を用いて、温度、培養液の成分や量などの培養条件を同一にして培養する方法、(2) 複数の組織や細胞群を一つの培養皿に間隔をあけて接着し、培養する方法、(3) 培養皿の底面の上に、わずかなすき間ができるようにして隔壁を設け、このすき間にメチルセルローズ溶液をおくことにより、複数の細胞群が混在しないようにして、同一皿で培養する方法、などがあった。上記従来技術(1)においては、組織若しくは細胞群の個々の細胞が、代謝することによって、培養液の成分が変化するため、別々の培養皿で培養したのでは、培養皿によって培養液の成分が異なり、培養環境が培養皿によって異なる、という問題が生じる。更に、ある細胞群若しくは組織が分泌する物質や細胞群若しくは組織が発生する電気信号の、他の細胞群若しくは組織に対する効果を観察することができない、という問題点があった。また、上記従来技術(2)においては、単離した細胞群を混合しないように培養皿表面に固定するのは不可能であること、組織を利用した場合にも組織を構成する細胞が培養中に移動しそれぞれの組織の細胞が混ざり合うなどの問題点があった。また、上記従来技術(3)においては、細胞群同士が混在しないように培養することができるが、隔壁間の物質の移動がほとんど生じないため、従来技術(1)と同様に各区間の環境条件が異なるものになるなどの問題があった。また、神経細胞などを培養した場合、神経繊維が神経細胞から伸長し、隔壁と培養皿表面とのすき間を通して異なる区画の組織又は神経細胞間にシナプス結合が形成される。したがって、ある神経組織又は神経細胞群で発生する電気信号の他の区画に存在する神経組織又は神経細胞群への効果を観察することが

可能となる。しかしながら、隔壁が厚く、且つすき間の高さが非常に狭いため、シナプス結合の結合頻度が非常に弱く、お互いの相互作用を観察するには不十分であった。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上述した問題点を解消し、複数の細胞群及び組織が混ざり合うことなく、同一環境下で培養すること、及び神経組織及び神経細胞群などの培養においては、複数の細胞群及び組織が混ざり合うことなく同一環境下で培養できるだけでなく、細胞群及び組織間のシナプス結合が容易に且つ安定に形成されるように培養することを目的とする。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明の第1の発明は、細胞群又は組織を培養する方法に関する発明であって、培養用底板上に設けたコラーゲンゲルの薄膜を隔壁とした培養用セル中に、複数の細胞群若しくは組織をそれぞれ各壁間に挿入し、培養用溶液を添加後、各々の細胞群又は組織を同一環境下で培養し、各々の細胞群又は組織で、上記コラーゲンゲル薄膜を介して機能的なシナプスを形成させることを特徴とする。本発明の第2の発明は、上記第1の発明の実施に直接使用する装置に関する発明であって、培養用底板上に、複数の細胞群若しくは組織をそれぞれ挿入できるように隔壁を設けた培養用セルを設置した培養装置において、隔壁としてコラーゲンゲルの薄膜を用いたことを特徴とする。

【0005】 本発明を概説すると、本発明は、複数の細胞及び組織を培養する方法及び装置であって、コラーゲンゲルの薄膜を利用して隔壁を作成し、この隔壁を仕切りとする細胞培養用の皿によって、複数の細胞群若しくは組織が混合することなく、且つ同一環境下で培養し、更に神経細胞群又は神経組織が上記の仕切りを介して機能的なシナプスを形成することを特徴とする。本発明は前記の問題点を解決するために、コラーゲンゲルの薄膜を隔壁とした培養皿を用いて培養することが従来技術と異なる。

## 【0006】

【発明の実施の形態】 以下、図面を用いて本発明を具体的に説明する。図1は本発明装置の1例を模式的に示した概要平面図であり、図2は同じく側面図である。図1、図2において、1は培養用底板、2は培養用セル、3は細胞群若しくは組織(A)、4は細胞群若しくは組織(B)、5はコラーゲンゲル薄膜、6は培養用溶液、である。イオンや分子量の巨大でない物質はコラーゲンゲル膜を透過し、また、膜の厚さは薄いために物質の拡散に要する時間も少ない。したがって、コラーゲンゲル薄膜の両側での培養液の組成は、ほぼ常に同一に保たれる。また、神経細胞を培養すると、細胞体はコラーゲンゲル層を介して移動しないが、神経細胞からのびた神経突起はコラーゲンゲルの層を通して反対側に到達し、コ

ラーゲンゲル薄膜の両側の細胞同士が機能的なシナプスを形成する。図1、2ではコラーゲン薄膜によって二つの部分からなる例を示したが、全く同様の方法により三つ以上の細胞群及び組織を培養することが可能であり、本発明はこれを含んでいる。

【0007】図3は、コラーゲンゲル薄膜を利用した培養用皿を作るための一方法を示すフローチャートである。コラーゲンゲル薄膜は、まずコラーゲンタイプIのような室温でゲル化するコラーゲンを培養用塩溶液に溶解したものを用いて、図2の5に相当する部分に表面張力を利用して薄膜を作る(3-1)。これを37℃で数分間、例えば5分間インキュベートすることにより、コラーゲン溶液の薄膜はゲル化し、コラーゲンゲル薄膜となる(3-2)。コラーゲンゲル薄膜を挟んだ両側(図2の3及び4)に、細胞群若しくは組織片を静置した後(3-3)、培養液を添加し(3-4)、資料に応じた培養条件(温度、二酸化炭素濃度など)によって通常の方法で培養する(3-5)。

【0008】これらの測定は、例えば多数の微小電極を有した基板と記録装置とを有する機器により、細胞又は組織からの電気信号を測定することにより行うことができる。その機器の例としては、本発明者らの既特許出願である特願平6-316009号明細書に記載の機器が挙げられる。該明細書に記載の機器に関する発明を概説すれば、基板上に、培養液保持容器、該培養液に接した標準電極と1以上の微小電極、及び該各電極の電気絶縁用の絶縁層を装備した設備、該各電極よりの電圧の増幅器、該増幅器よりの信号の記録計、及びこれら各設備を接続する器具を備えてなることを特徴とする。更に、該装置の改良としては、該発明の装置において、各電極間に仕切り板を備えてなることを特徴とするものがある。

#### 【0009】

【実施例】以下、図面を参照して、本発明の実施例を説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

#### 【0010】実施例1

図1、図2に示すような装置を用いた本発明の1実施例を示す。動物から取り出した脳の細胞を通常の神経細胞培養と同様な方法で本発明を用いて培養する。培養開始後4日ほど経過するとコラーゲンゲル薄膜の両側の細胞群の中では、細胞間にシナプスが形成され、人工的な神経回路が再構成される。更に、1~2日経過すると、神経細胞からのびた神経突起がコラーゲンゲルの層を通過して反対側に到達し、コラーゲンゲル薄膜の両側の細胞同士がシナプスを形成する。しかしながら、神経細胞体は\*

\*コラーゲンゲル層には侵入することはできず、二つの神経細胞群は分離されたままである。

#### 【0011】実施例2

図4、図5は、多数の微小電極を有した基板と記録装置とを備えた装置(特願平6-316009号明細書に記載の装置)を用いて得られた、神経細胞の電気信号を示した図である。すなわち、図4、図5は、本発明を用いて培養した神経細胞から得られた電気信号の例を示す図である。図4において、Cx-1は大腦皮質の神経細胞群(I)、Cx-2は大腦皮質の神経細胞群(II)を意味する。また図5において、Cxは大腦皮質の神経細胞群、Thは視床の神経細胞群を意味する。

【0012】図4は2つの領域(Cx-1、Cx-2)にそれぞれ大腦皮質から得られた同種の細胞を培養した細胞から得られた電気信号の記録である。図4の例ではCx-1で発生した活動電位のバーストがCx-2に伝播しており、機能的なシナプスがコラーゲンゲル層を介して二つの領域間に形成されていることがわかる。図5は、大腦皮質(Cx)及び視床(Th)から得られた細胞を培養した細胞から得られた電気信号の記録である。図5の例では、それぞれの神経細胞群が全く同一の条件下で培養されたにもかかわらず、異なる電気的な特性を持っていることが示されている。

#### 【0013】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、複数の細胞群若しくは組織が混合することなく、且つ同一環境下で培養し、更に神経細胞群又は神経組織で上記の仕切りを介して機能的なシナプスを形成させることが、従来技術に比べ、容易且つ安定に行うことができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明装置の1例を模式的に示した概要平面図である。

【図2】図1に示した装置の側面図である。

【図3】コラーゲンゲル薄膜を利用した培養用皿を作るための一方法を示すフローチャートである。

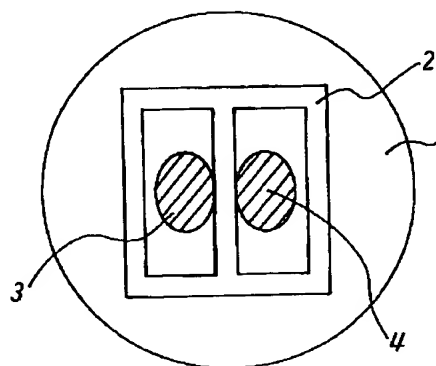
【図4】本発明を用いて培養した神経細胞から得られた電気信号の例を示す図である。

【図5】本発明を用いて培養した神経細胞から得られた電気信号の他の例を示す図である。

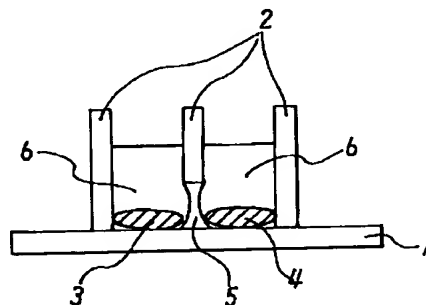
#### 【符号の説明】

1：培養用底板、2：培養用セル、3：細胞群若しくは組織(A)、4：細胞群若しくは組織(B)、5：コラーゲンゲル薄膜、6：培養用溶液

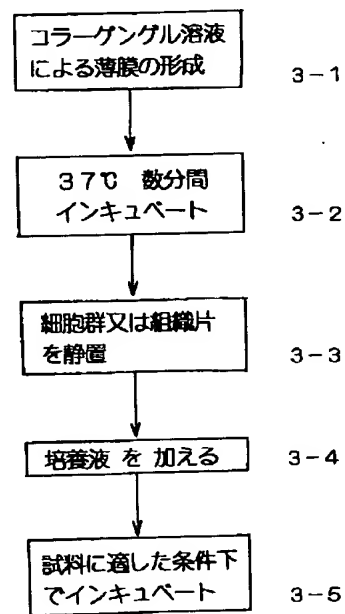
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

